EnVision™ G|2 System/AP, Rabbit/Mouse (Permanent Red)

N°de catálogo K5355

3ª edición

Para su uso con anticuerpos primarios de conejo y de ratón. Para 50 ó 500 ensayos.

Índice

Página

Indicaciones de uso 3
Resumen y explicación 3
Principios del procedimiento 3
Reactivos 3
Reactivos suministrados 3
Material necesario pero no suministrado 4
Precauciones 5
Preparación de las muestras 6
Procedimiento 6
A. Preparación de los reactivos 6
B. Procedimiento de tinción manual 6
C. Procedimiento de tinción para instrumentos Dako Autostainer 7
Interpretación de los resultados 9
Referencias 10
Explicación de los símbolos 10

Indicaciones de uso

Para uso en diagnóstico *in vitro*.

Este sistema de visualización está indicado para su uso en inmunocitoquímica con anticuerpos primarios de ratón o de conejo, suministrados por el usuario, para la detección de antígenos en tejidos fijados con formol e incluidos en parafina, cortes congelados o frotis celulares fijados. Este sistema puede utilizarse en procedimientos manuales o con instrumentos Dako Autostainer.

La interpretación de los resultados debe realizarla un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y otras pruebas diagnósticas.

Resumen y explicación

EnVision™ G|2 System/AP es un kit de visualización EnVision™ de segunda generación. Este sistema es útil para la detección de los antígenos presentes en concentraciones bajas. Este sistema no contiene biotina, por lo que se reduce significativamente la tinción inespecífica derivada de la actividad endógena de la avidina-biotina. Debido a la elevada sensibilidad del sistema, las diluciones óptimas de los anticuerpos primarios pueden ser varias veces superiores a las utilizadas con los métodos tradicionales EnVision™, ABComplex o LSAB.

Principios del procedimiento

El kit se emplea en un procedimiento de tres pasos en el que el primer paso es la incubación de la muestra con un anticuerpo primario de ratón o de conejo diluido adecuadamente, y el segundo paso es la incubación con el reactivo EnVision™ G|2, Rabbit/Mouse (LINK) del kit. Este reactivo es un polímero de dextrano, que también está recubierto de anticuerpos frente a las inmunoglobulinas de conejo y de ratón. En el tercer paso, se añade un polímero de amplificación marcado con fosfatasa alcalina. La reacción se visualiza mediante el Permanent Red Chromogen también incluido en este kit.

Reactivos

Reactivos suministrados

Nº de catálogo K5355 – 50 ensayos

Los materiales que se indican a continuación son suficientes para realizar 50 ensayos.
El número de los ensayos se basa en el uso de 200 µL de cada reactivo por ensayo:

Vial 1	1 x 11 mL	RABBIT/MOUSE (LINK) **Rabbit/Mouse (LINK)** Listo para su uso. Dextrano unido a anticuerpos secundarios frente a inmunoglobulinas de conejo y de ratón. En solución tamponada que contiene proteína estabilizante y conservante.
Vial 2	1 x 11 mL	AP ENZYME (ENHANCER) **AP Enzyme (ENHANCER)** Listo para su uso. Polímero de amplificación marcado de fosfatasa alcalina en solución tamponada que contiene proteína estabilizante y conservante.

Vial 3	1 x 11 mL	SUBSTRATE BUFFER	**Permanent Red Substrate Buffer** Solución de tampón sustrato.
Vial 4	1 x 150 µL	PERMANENT RED CHROMOGEN	**Permanent Red Chromogen** Solución de cromógeno rojo permanente.

Nº de catálogo K5355 – 500 ensayos
Los materiales que se indican a continuación son suficientes para realizar 500 ensayos. El número de los ensayos se basa en el uso de 200 µL de cada reactivo por ensayo:

Vial 1	10 x 11 mL	RABBIT/MOUSE (LINK)	**Rabbit/Mouse (LINK)** Listo para su uso. Dextrano unido a anticuerpos secundarios frente a inmunoglobulinas de conejo y de ratón. En solución tamponada que contiene proteína estabilizante y conservante.
Vial 2	10 x 11 mL	AP ENZYME (ENHANCER)	**AP Enzyme (ENHANCER)** Listo para su uso. Polímero de amplificación marcado de fosfatasa alcalina en solución tamponada que contiene proteína estabilizante y conservante.
Vial 3	10 x 11 mL	SUBSTRATE BUFFER	**Permanent Red Substrate Buffer** Solución de tampón sustrato.
Vial 4	1 x 1,5 mL	PERMANENT RED CHROMOGEN	**Permanent Red Chromogen** Solución de cromógeno rojo permanente.

Material necesario pero no suministrado
Paños absorbentes
Agua amoniacal, 37 mmol/L (opcional)
Diluyente de anticuerpos, nº de catálogo S0809 o S2022 de Dako
Contratinción; hematoxilina, como Mayer's Hematoxylin de Dako basada en agua (nº de catálogo S3309)
Cubreobjetos
Dako Autostainer instrument (opcional)
Agua destilada o desionizada
Epitope Retrieval Solution
Etanol, 95% y 70%
Cámara húmeda (opcional)
Microscopio (aumento de 20-800x)
Medios de montaje, como Dako Glycergel™ Mounting Medium (nº de catálogo C0563), Dako Faramount, Aqueous Mounting Medium, Ready-to-Use (nº de catálogo S3025) o medio de montaje no acuoso permanente Dako (nº de catálogo S3026)
Tejidos positivos y negativos para su uso como controles del procedimiento
Anticuerpos primarios y reactivos de control negativos
Portaobjetos, SuperFrost Plus, recubiertos con poli-L-lisina o Dako Silanized Slides (nº de catálogo S3003)
Jarras o baños de tinción

Cronómetro (capaz de cronometrar intervalos de 2-40 minutos)
Frascos de lavado
Wash Buffer, nº de catálogo S3006 de Dako
Baño maría con tapa
Xileno, tolueno o sustitutos de xileno

Precauciones

1. Para usuarios profesionales.
2. El vial 1, Rabbit/Mouse (LINK), y el vial 2, AP Enzyme (ENHANCER), contienen material de origen animal. Al igual que con cualquier producto de origen biológico, deberán aplicarse los procedimientos de manipulación adecuados.
3. No utilice el vial 3, Permanent Red Substrate Buffer, si se observa un precipitado a temperatura ambiente.
4. No exponga el vial 4, Permanent Red Chromogen, ni la Substrate Working Solution preparada a luz intensa.
5. El vial 4, Permanent Red Chromogen, está etiquetado como:
   Tóxico.
   R45 Puede causar cáncer.
   S35 Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.
   S45 En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstrele la etiqueta).
   S53 Evítese la exposición. Obténganse instrucciones especiales antes de su uso.

   Atención. Este producto contiene una sustancia que no está totalmente probada.
   Esta clasificación se ha realizado tomando exclusivamente como base una comparación con sustancias con estructuras similares.

   Como regla general, los menores de 18 años no pueden manipular este producto. Debe informarse debidamente a los usuarios acerca del procedimiento adecuado de trabajo, las propiedades peligrosas del producto y las instrucciones de seguridad necesarias.
   Le rogamos que consulte la hoja de datos de seguridad (MSDS) para obtener información más detallada.
6. Este producto contiene azida de sodio (NaN_3), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. A las concentraciones en las que está presente en el producto, aunque no se clasifican como peligrosas, la azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre, lo que formará acumulaciones de azidas metálicas muy explosivas. Una vez desechado el producto, deje correr abundante cantidad de agua para evitar acumulaciones de azidas metálicas en las cañerías.
7. Utilice el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel.
8. La solución no utilizada debe desecharse con arreglo a las normativas locales, provinciales y nacionales.

Almacenamiento

Almacene el kit a una temperatura de 2-8 °C. No utilice el producto después de la fecha de caducidad impresa en el kit. No se debe intercambiar componentes del kit de lotes diferentes. Si los reactivos se almacenan en condiciones diferentes a las especificadas, el usuario debe comprobar dichas condiciones (1). Si observa una tinción inesperada que no puede explicarse por variaciones en los procedimientos del laboratorio y sospecha de la existencia de un problema con el producto, póngase en contacto con nuestros servicios técnicos.

Preparación de las muestras

Para su uso con cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina y con cortes de tejidos congelados y frotis celulares fijados. Pueden utilizarse diferentes agentes de fijación para la conservación de las muestras. Deberán emplearse los métodos habituales de procesamiento de tejidos para la tinción inmunocitoquímica con todos los cortes de tejido (2). El grosor adecuado de los cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina y de los cortes congelados es de 4-6 µm. La muestra debe montarse en portaobjetos para microscopio. Los cortes deben montarse en los portaobjetos de la forma más plana y estirada que sea posible. Si están demasiado arrugados, esto influirá negativamente en los resultados de la tinción.

NOTA: Para su uso en instrumentos Dako Autostainer, los portaobjetos no deben superar un ancho de 26 mm con el fin de que ajusten en el soporte para portaobjetos.

Los cortes incluidos en parafina deben montarse desde un baño maría precalentado que contenga agua destilada o desionizada. El baño de agua no debería contener aditivos (como gelatina, poli-L-lisina, etc.). Los cortes deben secarse mediante calor, generalmente a una temperatura no superior a 60 ℃ durante al menos 60 minutos (p. ej., durante una noche). Con el fin de asegurar una adherencia adecuada de los cortes a los portaobjetos, es importante secar el agua de debajo de los cortes antes del proceso de secado en el horno.

Procedimiento

A. Preparación de los reactivos

A.1 Substrate Working Solution

Se prepara la solución de trabajo de Permanent Red Chromogen mezclando bien 100 partes de Permanent Red Substrate Buffer (Vial 3) con 1 parte de Permanent Red Chromogen (Vial 4). Por ejemplo, mezcle 1 mL de Permanent Red Substrate Buffer (Vial 3) con 10 µL de Permanent Red Chromogen (Vial 4). Prepare sólo el volumen necesario para el número de portaobjetos que se va a teñir. Utilice la solución en los 30 minutos siguientes. La Substrate Working Solution debe prepararse en un Autostainer Reagent Vial cuando se utiliza en el Dako Autostainer instrument.

A.2 Instrucciones para la dilución óptima de los anticuerpos primarios

El uso de EnVision™ G|2 System/AP requiere la dilución de los anticuerpos primarios concentrados Dako cuando se aplican. Los anticuerpos primarios Dako deberían diluirse habitualmente 4-10 veces más de las recomendaciones indicadas en los folletos informativos del anticuerpo primario individual cuando se utilizan con EnVision™ G|2 System/AP. Esta es tan sólo una orientación, por lo que el usuario debe determinar la dilución adecuada.

Los anticuerpos primarios deben diluirse con Dako Antibody Diluent (nº de catálogo S0809 o S2022).

B. Procedimiento de tinción manual

Los siguientes pasos de pretratamiento deben realizarse antes de utilizar EnVision™ G|2 System/AP con cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina. Se debe eliminar la parafina y rehidratar la muestra. Algunas muestras deben someterse al desenmascaramiento del epítopo mediante la recuperación del epítopo inducida por calor o digestión enzimática. Consulte el folleto informativo del anticuerpo primario Dako individual para obtener información específica acerca de la preparación de las muestras. Después del desenmascaramiento, la muestra debe enjuagarse suavemente con solución de tampón de lavado de un frasco de lavado (no dirija el flujo directamente sobre el tejido) y colocarse durante 5 minutos en un baño de tampón de lavado recién preparado.

Todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente (20 a 25 ℃) antes de la inmunotinción. De forma similar, todas las incubaciones deben realizarse a temperatura ambiente.

No deje que las muestras se sequen durante el procedimiento de tinción. Las muestras secas pueden causar un aumento de la tinción inespecífica.

Paso 1: Anticuerpo primario o reactivo de control negativo
Elimine el exceso de tampón de lavado y limpie con cuidado alrededor de la muestra para eliminar cualquier resto de líquido y mantener el reactivo en la zona requerida. Aplique 200 µL de anticuerpo primario diluido adecuadamente o de reactivo de control negativo para cubrir la muestra. Incúbela durante 30 (± 1) minutos. Enjuague suavemente la muestra con solución de tampón de lavado de un frasco de lavado (no dirija el flujo directamente sobre el tejido) y colóquela durante 5 minutos en un baño de tampón de lavado recién preparado.

Paso 2: Vial 1, Rabbit/Mouse (LINK)
Elimine el exceso de tampón de lavado y limpie los portaobjetos como se indicó anteriormente. Aplique 200 µL de Rabbit/Mouse (LINK) para cubrir la muestra. Incúbela durante 30 (± 1) minutos. Enjuague dos veces la muestra de la forma descrita en el paso 1.

Paso 3: Vial 2, AP Enzyme (ENHANCER)
Elimine el exceso de tampón de lavado y limpie los portaobjetos como se indicó anteriormente. Aplique 200 µL de AP Enzyme (ENHANCER) para cubrir la muestra. Incúbela durante 30 (± 1) minutos. Enjuague dos veces la muestra de la forma descrita en el paso 1.

Paso 4: Substrate Working Solution
Prepare la Substrate Working Solution de la forma descrita en la sección A.1. La Substrate Working Solution preparada debe utilizarse en los 30 minutos siguientes.

Elimine el exceso de líquido golpeando suavemente los portaobjetos y límpielos de la forma indicada anteriormente. Aplique 200 µL de Substrate Working Solution para cubrir la muestra. Incúbela durante 5-20 minutos. Enjuague suavemente los portaobjetos con agua destilada o desionizada. Recoja los residuos que contengan cromógeno en un recipiente para desechos peligrosos para eliminarlos de forma adecuada. Ponga durante 5 minutos los portaobjetos enjuagados en un baño maría de agua destilada o desionizada recién preparado.

Paso 5: Contratinción (instrucciones válidas para la hematoxilina)
Sumerja los portaobjetos en un baño de hematoxilina. La duración de la incubación depende de la concentración de la hematoxilina usada. Después de la contratinción con hematoxilina, enjuague bien en agua destilada o desionizada.

Opcional: Sumerja los portaobjetos con tejido en un baño de 37 mmol/L de agua amoniacal y enjuáguelos suavemente en agua destilada o desionizada durante 2-5 minutos. El agua de amoníaco (37 mmol/L) se prepara mezclando 2,5 mL de hidróxido amónico a 15 mol/L (concentrado) con 1 litro de agua destilada o desionizada. El agua amoniacal de 37 mmol/L no utilizada puede almacenarse a temperatura ambiente (20-25 ℃) en un frasco bien cerrado durante 12 meses.

Paso 6: Montaje
Si se utilizan medios de montaje acuosos, se recomienda utilizar medios como Dako Glycergel™ Mounting Medium (nº de catálogo C0563) o Faramount Aqueous Mounting Medium (nº de catálogo S3025).

Para montajes no acuosos permanentes, se recomienda el uso de Permanent Mounting Media de Dako (nº de catálogo S3026) tras haber dejado secar completamente los portaobjetos al aire.

C. Procedimiento de tinción para instrumentos Dako Autostainer

Todos los reactivos del kit, con la excepción del Vial 4, se suministran con Autostainer Reagent Vials. La Substrate Working Solution debe prepararse en un Autostainer Reagent Vial cuando se utiliza en el Dako Autostainer instrument. EnVision™ G|2 System/AP se ha adaptado para su uso con los instrumentos Dako Autostainer de acuerdo con la plantilla abajo descrita.

Antes de la tinción de acuerdo con la plantilla de instrumentos Dako Autostainer, le rogamos que lea atentamente el **Manual del usuario del Autostainer Instrument correspondiente**.

Antes de iniciar el Autostainer Instrument, deben introducirse los portaobjetos y los reactivos de acuerdo con el **Slide Layout Map** y **Reagent Layout Map**.

Los siguientes pasos de pretratamiento deben realizarse antes de utilizar EnVision™ G|2 System/AP con cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina. Se debe eliminar la parafina y rehidratar la muestra. Algunas muestras deben someterse al desenmascaramiento del epítopo mediante la recuperación del epítopo inducida por calor o digestión enzimática. Consulte el folleto informativo del anticuerpo primario Dako individual para obtener información específica acerca de la preparación de las muestras. Después del desenmascaramiento, la muestra debe enjuagarse suavemente con solución de tampón de lavado de un frasco de lavado (no dirija el flujo directamente sobre el tejido) y colocarse durante 5 minutos en un baño de tampón de lavado recién preparado.

Todos los reactivos deben equilibrarse a temperatura ambiente (20 a 25 ℃) antes de la inmunotinción. De forma similar, todas las incubaciones deben realizarse a temperatura ambiente.

No deje que las muestras se sequen durante el procedimiento de tinción. Las muestras secas pueden causar un aumento de la tinción inespecífica.

Paso 1: Programación del Autostainer Instrument
Antes de la primera aplicación del EnVision™ G|2 System/AP en el Autostainer Instrument, debe crearse una nueva plantilla. Consulte la plantilla abajo indicada y el Manual del usuario del Autostainer correspondiente.

Plantilla: K5355

1. Rinse Buffer
2. Primary Antibody - 200
3. Rinse Buffer
4. Secondary Reagent - 200
5. Rinse Buffer
6. Auxiliary - 200
7. Rinse Buffer
8. Tertiary Reagent - 200
9. Rinse Buffer
10. Auxiliary - 200
11. Rinse Buffer
12. *Swtch
13. Substrate-Batch - 200
14. Rinse Buffer
15. *Swtch
16. Auxiliary
17. Rinse Buffer
18. Auxiliary

NOTA: El paso “Auxiliary” (Auxiliar) debe ajustarse a “Rinse Buffer” (Enjuagar el tampón) en sesiones de tinción con 10 portaobjetos o menos. En el caso de sesiones de tinción con más de 10 portaobjetos, el paso “Auxiliary” (Auxiliar) debe ajustarse a “None” (Ninguno). De esta manera se aseguran tiempos de lavado semejantes.

Antes de cargar los portaobjetos de acuerdo con la **PROGRAM STAINING RUN SCREEN**, deben añadirse a la lista de reactivos los siguientes reactivos. Le rogamos que consulte la Tabla 1 para obtener el nombre, el paso de la plantilla y el tiempo de incubación, y el Manual del usuario del Autostainer Instrument correspondiente.

Tabla 1. Modificaciones necesarias de la lista de reactivos

Reactivo	**Nº de catálogo**	**Paso de la plantilla**	**Tiempo de incubación**
Los anticuerpos primarios no están todavía en la lista del Autostainer	Individual	Primary Antibody (Anticuerpo primario)	30 minutos
Rabbit/Mouse (LINK)	K5355	Secondary Reagent (Reactivo secundario)	30 minutos
AP Enzyme (ENHANCER)	K5355	Tertiary Reagent (Reactivo terciario)	30 minutos
Substrate Working Solution	K5355	Substrate-Batch (Lote del sustrato)	10 minutos

Paso 2: Protocolo de tinción
Cargue la plantilla (**K5355**) de los kits de detección EnVision™ G|2 System/AP, Rabbit/Mouse (Permanent Red) en la **PROGRAM STAINING RUN SCREEN**. Especifique el número de portaobjetos de la sesión y cargue los reactivos con los tiempos de incubación de la plantilla. La posición de los portaobjetos se mostrará en la **Slide Layout Map Screen** y la posición y el volumen del reactivo que debe cargarse en el Autostainer Instrument se mostrarán en la **Reagent Layout Map Screen**. Consulte también el Manual del usuario.

Antes de cargar los portaobjetos de acuerdo con la **Slides Layout Map Screen**, se recomienda mojar previamente los portaobjetos durante 5 minutos en el Tampón de lavado Dako (nº de catálogo S3006). Coloque los viales en la gradilla de reactivos de acuerdo con el **Reagent Layout Map**. Tenga cuidado de cargar los reactivos y los volúmenes correctos. Preste especial atención a la carga de los viales con los anticuerpos primarios. Purgue el agua y las bombas de tampón. Inicie el programa. Después de que finalice el programa, enjuague los portaobjetos con agua destilada o desionizada. Para la contratinción y el montaje, consulte los pasos 5 y 6 de la sección B.

Interpretación de los resultados

El uso del Permanent Red Chromogen causa un producto permanente de reacción de color rojo en el lugar del antígeno diana que puede visualizarse con un microscopio óptico normal.

La actividad endógena de la fosfatasa alcalina en algunos tejidos puede causar resultados falso positivos. Dicha actividad endógena puede inhibirse mediante el uso de Dual Endogenous Enzyme Block de Dako (nº de catálogo S2003) o de Levamisole (nº de catálogo X3021). Levamisole no inhibe la forma intestinal o placentaria de la fosfatasa alcalina y puede no ser útil para la tinción de las muestras que contengan estas isoenzimas. Consulte los folletos informativos de los productos S2003 y X3021 para ver las instrucciones de uso.

Si no hay presente ninguna tinción inespecífica, se reconocerá como una tinción difusa de color rojo en los portaobjetos tratados con el reactivo de control negativo.

Los núcleos se teñirán de color azul gracias a la contratinción con hematoxilina.

Referencias

1. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rule, 57CFR7163, February 28, 1992
2. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. St. Louis: CV Mosby Company; 1980

Explicación de los símbolos

REF	Referencia	2 °C 8 °C	Limitación de temperatura		Fecha de caducidad
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*	Σ	Contiene suficiente para <n> ensayos		Fabricante
	Consulte las instrucciones de uso	LOT	Código del lote		Tóxico

Fabricado por:
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup
Dinamarca
www.dako.com

Tel. +45 44 85 95 00
Fax +45 44 85 95 95